



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 965 619**

⑮ Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)
A01N 1/02 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2006 E 12159369 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023 EP 2479259**

④ Título: **Métodos para la preparación de composiciones celulares novedosas**

⑩ Prioridad:

21.04.2005 US 110879

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.04.2024

⑦ Titular/es:

**IN VITRO, INC. (100.0%)
1450 South Rolling Road
Baltimore, MD 21227, US**

⑧ Inventor/es:

**DRYDEN, DANIEL y
HARDY, JAMES**

⑨ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 965 619 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la preparación de composiciones celulares novedosas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas:

Esta solicitud es una continuación de la Solicitud de Documento de Patente de los Estados Unidos de Número de Serie 11/110,879 (presentada el 21 de abril de 2005).

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de composiciones de hepatocitos como se define en las reivindicaciones adjuntas. En particular, la descripción se refiere a métodos de procesamiento de preparaciones de tales células para permitir su criopreservación y descongelación repetidas manteniendo al mismo tiempo una viabilidad sustancial. La descripción también se refiere a preparaciones de células (por ejemplo, hepatocitos) que han sido criopreservadas y descongeladas repetidamente.

Antecedentes de la invención:

Los hepatocitos son células parenquimatosas del hígado y constituyen hasta el 60-80 % de la masa citoplasmática del hígado. Los hepatocitos juegan un papel clave en la desintoxicación, modificación y excreción de sustancias exógenas y endógenas (Ponsoda, X. et al. (2004) "Drug Metabolism by Cultured Human Hepatocytes: How Far Are We From *In Vivo* Reality?", Alternative Lab Anim. 32(2): 101-110). Una de las funciones desintoxicantes de los hepatocitos es transformar el amoníaco en urea para su excreción. También son importantes en la síntesis y almacenamiento de proteínas, en la transformación de los carbohidratos y en la síntesis del colesterol, sales biliares y fosfolípidos (Postic, C. et al. (2004) "Role Of The Liver In The Control Of Carbohydrate And Lipid Homeostasis", Diabetes Metab. 30(5): 398-408). El hepatocito es la única célula del cuerpo que produce albúmina, fibrinógeno y el grupo de la protrombina de los factores de coagulación. Es el sitio principal para la síntesis de lipoproteínas, ceruloplasmina, transferrina y glicoproteínas. Los hepatocitos fabrican sus propias proteínas estructurales y enzimas intracelulares. Los hepatocitos también son depósitos importantes de vitamina B12 y hierro.

Debido a estos atributos, los hepatocitos aislados y cultivados se han vuelto muy atractivos como sistemas modelo para el estudio de las funciones hepáticas (Chesne, C. et al. (1993) "Viability and Function in Primary Culture of Adult Hepatocytes of Various Animal Species and Human Beings After Cryopreservation", Hepatology 18(2): 406-414; Guillouzo, A. et al. (1986) "Isolated and Cultured Hepatocytes," París: les Editions INSERM y Londres: John Libbey Eurotext); Ponsoda, X. et al. (2004) "Drug Metabolism Using Cultured Human Hepatocytes: How Far Are We From *The In Vivo Reality?*", Alternative Lab Anim. 32(2): 101-110; Gomez-Lechon, M. J. et al. (2004) "Human Hepatocytes In Primary Culture: The Choice To Investigate Drug Metabolism In Man", Curr Drug Metab. 5(5): 443-462; Lemaigne, F. et al. (2004) "Liver Development Update: New Embryo Models, Cell Lineage Control, And Morphogenesis", Curr Opin Genet Dev. 14(5): 582-590; Nanji, A. A. (2004) "Animal Models Of Nonalcoholic Fatty Liver Disease And Steatohepatitis", Clin Liver Dis. 8(3): 559-574; Hewitt, N. J. et al. (2004) "Cryopreserved Rat, Dog, And Monkey Hepatocytes: Measurement Of Drug-Metabolizing Enzymes In Suspensions And Cultures", Hum Exp Toxicol. 23 (6): 307-316).

Además de su uso en modelos hepáticos, los hepatocitos tienen el potencial de usarse para producir hígados bioartificiales (BAL, por sus siglas en inglés) o en trasplantes de hepatocitos que pueden proporcionar funciones hepáticas para personas que padecen enfermedades hepáticas o insuficiencia hepática. Los hígados bioartificiales (BAL) se describen por Anand, A. C. (1996) "Bioartificial Livers: The State Of The Art", Trop Gastroenterol. 17(4): 197-198, 202-211; Gan, J. H.. et al. (2005) "Hybrid Artificial Liver Support System For Treatment of Severe Liver Failure", World J Gastroenterol. 11(6): 890-894; Fukuda, J. et al. (2004) "Hepatocyte Organoid Culture In Elliptical Hollow Fibers To Develop A Hybrid Artificial Liver", Int J Artif Organs. 27(12): 1091-1099; Meng, Q. et al. (2004) "Hepatocyte Culture In Bioartificial Livers With Different Membrane Characteristics" Biotechnol Lett. 26(18): 1407-1412; Sekido, H. et al. (2004) "Usefulness Of Artificial Liver Support For PreTransplant Patients With Fulminant Hepatic Failure", Transplant Proc. 36(8): 2355-2356; Documentos de Patente Internacional de Números WO03/105663A2, WO05/000376A2, y Documento de Patente de los EE.UU. de Número 6.759.245. El trasplante de hepatocitos se describe por Chan, C. et al. (2004) "Liver Tissue Engineering For Adjunt And Temporary Liver Support: Critical Technologies", Liver Transpl. 10(11): 1331-1342; Lee, S. W. et al (2004) "Hepatocyte Transplantation: State Of The Art And Strategies For Overcoming Existing Hurdles", Ann. Hepatol. 3(2): 48-53; Horslen, S. P. (2004) "Hepatocyte Transplantation", Transplantation 77(10): 1481-1486; Burlina, A. B. (2004) "Hepatocyte Transplantation For Inborn Errors Of Metabolism", J. Inherit. Metab. Dis. 27(3): 373-83; y Fox, I. J. et al. (2004) "Hepatocyte Transplantation", Am. J. Transplant. 4 Suppl. 6: 7-13.

Un factor limitante en el desarrollo de tales sistemas modelo y en el desarrollo de hígados bioartificiales (BAL) ha sido la fuente irregular y la disponibilidad limitada de hepatocitos, especialmente hepatocitos humanos. Los hepatocitos frescos sólo se pueden obtener a partir de resecciones hepáticas o de hígados no trasplantables de donantes multiorgánicos (Lloyd, T. D. R. et al. (2003) "Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking" Cell And Tissue Cultures Banking 4: 3-15). El suministro de dicho tejido es inconsistente y a menudo geográficamente inconveniente a la luz de la vida útil funcional limitada del tejido hepático (Smrzova, J. et al. (2001)

"Optimization Of Porcine Hepatocytes Cryopreservation By Comparision Of Viability And Enzymatic Activity Of Fresh And Cryopreserved Cells", Acta Veterinaria Brunensis 70: 141-147).

Un enfoque para abordar este problema ha implicado el desarrollo de condiciones de almacenamiento de los hepatocitos que permitan que los hepatocitos se mantengan a lo largo del tiempo preservando sus funciones celulares.

- 5 Para abordar esta necesidad se han desarrollado métodos de criopreservación para el almacenamiento de hepatocitos (véase, Lloyd, T. D. R. et al. (2003) "Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking", Cell And Tissue Culture Banking 4: 3-15; Loretz, L. J. et al. (1989) "Optimization Of Cryopreservation Procedures For Rat and Human Hepatocytes", Xenobiotica 19(5): 489-498; Shaddock, J. G. et al. (1993) "Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Rat Hepatocytes: Effects On Substrate-Specific Cytochrome P450-Dependent Activities And Unscheduled DNA Synthesis", Cell Biol Toxicol. 9(4): 345-357; Novicki, D. L. et al. (1982) "Cryopreservation Of Isolated Rat Hepatocytes", In Vitro. 18(4): 393-399; Zaleski, J. et al. (1993) "Preservation Of The Rate And Profile Of Xenobiotic Metabolism In Rat Hepatocytes Stored In Liquid Nitrogen", Biochem Pharmacol. 46(1): 111-116). Shibata et al. (2002) "Prediction Of Hepatic Clearance And Availability by Cryopreserved Human Hepatocytes: An Application Of Serum Incubation Method", Drug Metabolism and Disposition 30: 892-896 Ostrowska, A. et al. (2000) "Investigation Of Functional And Morphological Integrity Of Freshly Isolated And Cryopreserved Human Hepatocytes", Cell and Tissue Bank 1: 55-68. Normalmente, tales medidas comprenden el almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) o en nitrógeno gaseoso congelado (-150°C). Se ha descubierto que la capacidad de recuperar células viables descongeladas depende de múltiples factores, tales como la velocidad de congelación, la concentración de hepatocitos, el tipo de crioprotector empleado y la temperatura de enfriamiento final. Normalmente se han empleado concentraciones celulares de 10^6 - 10^7 células/ml. Los hepatocitos aislados normalmente se incuban en suspensión durante un período (por ejemplo, 4-48 horas) para permitirles recuperarse del proceso de aislamiento. Posteriormente, se añade un crioprotector (tal como glicerol, DMSO, polivinilpirrolodina o dextrano) y se congelan los hepatocitos. La técnica ha desarrollado diversos procedimientos de congelación, todos diseñados para minimizar o prevenir la aparición de hielo intracelular. Las velocidades de congelación suelen variar típicamente de -0,05 °C/min a -50 °C/min (véase, Lloyd, T. D. R. et al. (2003) "Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking", Cell and Tissue Culture Bank 4: 3-15).

Si bien el desarrollo de métodos de criopreservación para el almacenamiento de hepatocitos ha facilitado significativamente la disponibilidad de hepatocitos humanos, se ha descubierto que la criopreservación causa una disminución significativa en la viabilidad celular (por ejemplo, 25-35 %) (Dou, M. et al. (1992) "Thawed Human Hepatocytes In Primary Culture", Cryobiology 29: 454-469; Alexandre, E. et al. (2002) "Cryopreservation Of Adult Human Hepatocytes Obtained From Resected Liver Biopsies", Cryobiology 44: 103-113). Condouris, J. A. et al (1993) informaron una viabilidad del 67 % después de 24 horas, que disminuyen al 49 % después de 14 días (Condouris, J. A. et al. (1993) "Cryopreservation Of Human Adult Hepatocytes For Use In Drug Metabolism And Toxicity Studies", Xenobiotica. 23(12): 1399-1409). Adams, R. M. et al. han informado que la viabilidad de los hepatocitos se puede

- 35 mejorar a más del 90 % usando líquidos de criopreservación especializados; sin embargo, se encontró que solo el 16 % de las células eran capaces de replicarse (Adams, R. M. et al. (1995) "Effective Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Human Hepatocytes With Recovery Of Viability, Differentiation, And Replicative Potential", Cell Transplant. 4(6): 579-586). Los métodos de criopreservación se describen en los Documentos de Patente de los EE.UU. de Números 5.795.711, 6.136.525, 5.895.745; en las Publicaciones de Documentos de Patente Internacional de Números WO04/009766, WO92/12722, WO/0153462, en el Documento de Patente Europea de Número EP0834252B y en las Solicitudes de Documentos de Patentes de los Estados Unidos de Números de Publicación US20020039786A1, US20030134418A1. La mala recuperación de las células cuando se criopreservan continúa limitando el uso de hepatocitos en modelos hepáticos *in vitro*.

45 Un segundo problema importante que afecta el uso de hepatocitos frescos y criopreservados es la variación en la expresión de las enzimas hepáticas que se observa en el tejido de diferentes donantes (Li, A. P. et al. (1999) "Present Status Of The Application Of Cryopreserved Hepatocytes In The Evaluation Of Xenobiotics: Consensus Of An International Panel Of Experts", Chem Biol Interact. 121(1): 117-123; Li, A. P. et al. (1999) "Cryopreserved Human Hepatocytes: Characterization Of Drug-Metabolizing Enzymes Activities And Applications In Higher Throughput Screening Assays For Hepatotoxicity, Metabolic Stability, And Drug-Drug Interaction Potential", Chem Biol Interact.

- 50 121(1): 17-35; O'Brien, Z. Z. et al. (sin fecha) "The Construction Of A Representative Human Cryopreserved Hepatocytes Pool For Metabolism Study", www.lionscience.com/repository/ISSX-2002.pdf). Una solución a esta variación de muestras implica combinar muestras de diferentes fuentes para producir una preparación de hepatocitos "compuesta" que tenga las características "promedio" de las células hepáticas. Sin embargo, se ha citado que la frecuencia de recepción de tejido fresco y la necesidad de criopreservar los hepatocitos inmediatamente después del aislamiento impiden la preparación de grupos de hepatocitos. Por lo tanto, varias empresas (por ejemplo, Xenotech, LLC; BD Biosciences) se abstienen de vender hepatocitos combinados, lo que obliga al usuario final a descongelar y combinar hepatocitos de varios donantes diferentes. Esta dificultad persiste a pesar de que los hepatocitos humanos criopreservados combinados son un modelo válido para estudios metabólicos (Zhang, J. G. et al. (sin fecha) "Validation Of Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes As A Model For Metabolic Studies http://www.bdbiosciences.com/3iscovery_lab-ware/gentest/products/pdf/S04T126.pdf).

60 Por lo tanto, a pesar de todos los avances anteriores, siguen siendo necesarios procesos que permitan la disponibilidad de hepatocitos para la investigación médica y otros fines. Además existe la necesidad de una fuente estable y reproducible de hepatocitos humanos. La presente invención permite la producción y disponibilidad de preparaciones

de hepatocitos que se pueden criopreservar y descongelar repetidamente sin una pérdida inaceptable de su viabilidad. Por lo tanto, la invención permite combinar múltiples muestras de hepatocitos para producir preparaciones de hepatocitos combinados, especialmente preparaciones de hepatocitos humanos criopreservados combinados. Usando este avance, ahora se encuentran disponibles comercialmente hepatocitos humanos criopreservados combinados en In Vitro Technologies (Baltimore, MD).

5 **Sumario:**

La presente descripción se refiere a nuevas composiciones celulares (por ejemplo, hepatocitos) y métodos para su preparación y uso. En particular, la descripción se refiere a métodos de procesamiento de preparaciones de células, especialmente de hepatocitos, para permitir su criopreservación y descongelación repetidas conservando al mismo 10 tiempo una viabilidad sustancial. La descripción también se refiere a preparaciones de células (por ejemplo, hepatocitos) que han sido criopreservadas y descongeladas repetidamente.

En detalle, la descripción se refiere particularmente a una preparación de hepatocitos multicriopreservados que comprende hepatocitos que se han congelado y descongelado al menos dos veces, en donde son viables más del 70 % o más de los hepatocitos de la preparación.

15 La descripción se refiere además a dicha preparación de hepatocitos multicriopreservados en donde los hepatocitos se seleccionan del grupo que consiste en hepatocitos humanos, hepatocitos porcinos, hepatocitos de simio, hepatocitos caninos, hepatocitos felinos, hepatocitos bovinos, hepatocitos equinos, hepatocitos ovinos y hepatocitos de roedores.

20 La descripción se refiere además a una preparación de hepatocitos multicriopreservados en donde la preparación comprende una preparación combinada de hepatocitos de múltiples fuentes, que pueden ser del mismo o diferente sexo, raza o estado de salud, o que proporcionan a la preparación combinada un nivel deseado de una actividad metabólica (especialmente en donde la actividad metabólica se selecciona del grupo que consiste en COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, 7-HCS, MEPH, TEST, PHEN y CZX).

25 La invención se refiere a un método para producir una preparación deseada de hepatocitos multicriopreservados, pudiendo los hepatocitos congelarse y descongelarse al menos dos veces, y en el que son viables más del 70 % de los hepatocitos de la preparación, comprendiendo el método:

- (A) someter los hepatocitos que han sido congelados y descongelados a separación por gradiente de densidad (especialmente centrifugación en gradiente de densidad de Percoll) para separar hepatocitos viables de hepatocitos no viables,
- 30 (B) recuperar los hepatocitos viables separados, y
- (C) criopreservar los hepatocitos viables recuperados para formar de ese modo la preparación deseada de hepatocitos.

35 La invención se refiere además a la realización de dicho método en el que los hepatocitos se seleccionan del grupo que consiste en hepatocitos humanos, hepatocitos porcinos, hepatocitos de simio, hepatocitos caninos, hepatocitos felinos, hepatocitos bovinos, hepatocitos equinos, hepatocitos ovinos y hepatocitos de roedores.

40 La invención se refiere además a la realización de dicho método en el que la preparación comprende una preparación combinada de hepatocitos de múltiples fuentes, que pueden ser del mismo o diferente género, raza o estado de salud, o que proporciona a la preparación combinada un nivel deseado de una actividad metabólica (especialmente en donde la actividad metabólica se selecciona del grupo que consiste en COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, 7-HCS, MEPH, TEST, PHEN y CZX).

45 La descripción también se refiere a un método para investigar el metabolismo de fármacos *in vitro* que comprende incubar hepatocitos de una preparación de hepatocitos multicriopreservados en presencia de un xenobiótico, y determinar el destino metabólico del xenobiótico, o el efecto del xenobiótico sobre los hepatocitos o sobre una enzima o actividad metabólica de los mismos, en donde los hepatocitos se han congelado y descongelado al menos dos veces, y en donde son viables más del 70 % o más de los hepatocitos de la preparación.

Descripción de las realizaciones preferidas:

La presente descripción se refiere a composiciones celulares y métodos para su preparación y uso. En particular, la descripción se refiere a métodos de procesamiento de preparaciones de células para permitir su criopreservación y descongelación repetidas manteniendo al mismo tiempo una viabilidad sustancial. Los métodos de la presente 50 descripción son generalmente aplicables a una amplia variedad de tipos de células, incluyendo hepatocitos, células del riñón, células del bazo, células del timo, células de la médula ósea, células madre, células musculares (incluyendo células de músculo cardíaco), células endocrinas (incluyendo células pancreáticas, células suprarrenales, células tiroideas, etc.) células epidérmicas, células endodérmicas, etc. A continuación se ilustran los métodos de la presente descripción con respecto a un tipo de células preferidas: hepatocitos.

La descripción también se refiere a preparaciones de células, por ejemplo, hepatocitos, que se han criopreservado y descongelado repetidamente para obtener una preparación de alta viabilidad útil para una variedad de propósitos experimentales, diagnósticos y terapéuticos. La presente descripción amplía la capacidad de los hepatocitos para ser criopreservados y descongelados para su uso posterior, de modo que permita que las preparaciones de hepatocitos se criopreserven y descongelen repetidamente sin una pérdida inaceptable de la viabilidad.

Tal como se usa en la presente invención, el término "preparación celular" significa una composición líquida o congelada de células de una o más fuentes (por ejemplo, "preparación de hepatocitos" significa una composición de células hepáticas de una o más fuentes). Las fuentes pueden ser células primarias que han sido disociadas o aisladas del tejido mediante resección, biopsia o de órganos de donantes, o pueden ser cultivos celulares secundarios, inmortalizados o transformados. Las células se pueden derivar de cualquier fuente de mamífero, incluidas fuentes humanas, porcinas, de simio, caninas, felinas, bovinas, equinas, ovinas o de roedores. Se prefiere el uso de células humanas, porcinas o de roedores (especialmente de rata). Preferiblemente, serán viables más del 70 % o más de los hepatocitos de tales preparaciones.

Tal como se usa en la presente invención, el término "preparación de células multicriopreservadas" significa una preparación de células que se ha congelado y luego descongelado al menos dos veces (por ejemplo, una "preparación de hepatocitos multicriopreservados" significa una preparación de hepatocitos que se ha congelado y luego descongelado al menos dos veces). Estas preparaciones pueden haber sido congeladas y descongeladas tres, cuatro, cinco o más veces.

El término "preparación combinada" significa una preparación de células (por ejemplo, hepatocitos) en la que las células (por ejemplo, hepatocitos) derivan de dos, tres, cuatro, cinco o más fuentes diferentes, tales como diferentes donantes, biopsias, resecciones de tejido de diferentes muestras de tejido o diferentes fuentes de tejido, o diferentes cultivos de células primarias, secundarias, inmortalizadas o transformadas (por ejemplo, hepatocitos). Las células de dichas preparaciones combinadas pueden ser células seleccionadas al azar, o se pueden haber seleccionado para proporcionar a la preparación combinada un nivel deseado de una o más actividades metabólicas (tal como, por ejemplo, una preparación de hepatocitos con un nivel deseado de COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, 7-HCS, MEPH, TEST, PHEN y/o actividad CZX), o una característica celular deseada (tal como, por ejemplo, una preparación de hepatocitos derivada de fuentes del mismo sexo, edad, raza (por ejemplo, caucásico, etc.) o estado de salud (por ejemplo, hepatocitos de hígado infectado por el virus de la hepatitis, hepatocitos de hígado infectado por VIH-I, hepatocitos de hígado sano, hepatocitos de fumadores de cigarrillos, hepatocitos de personas que padecen cirrosis hepática, o de otras enfermedades o afecciones). Por ejemplo, para obtener una preparación combinada de hepatocitos con actividad DEX mínima, se podría preparar una preparación combinada a partir de los Números de Lote 067, CEK, ETR, PFM, VTA o VWM (véase, Tabla III).

En una variante preferida de la descripción, ilustrada con respecto a las células de hepatocitos, la práctica del método comprende algunas o todas las etapas siguientes: el aislamiento de los hepatocitos, una primera criopreservación de los hepatocitos primarios aislados para obtener una primera preparación de hepatocitos criopreservados, la descongelación de la primera preparación de hepatocitos criopreservados para obtener hepatocitos viables, y la reformulación de los hepatocitos viables descongelados para permitir su posterior almacenamiento y uso mediante criopreservación y descongelación repetidas para obtener hepatocitos viables.

El aislamiento de hepatocitos

Se puede emplear o adaptar cualquiera de una amplia variedad de métodos para permitir el aislamiento de los hepatocitos primarios usados en la presente invención. Por ejemplo, las técnicas adecuadas para el aislamiento de hepatocitos se describen en Morsiani et al., (1995) "Automated Liver Cell Processing Facilitates Large Scale Isolation And Purification Of Porcine Hepatocytes", ASAIO Journal 41: 155-161 y en Seglen, P. O. (1976) "Preparation Of Isolated Rat Liver Cells", Meth. Cell Biol. 13: 29-83. Se hace referencia específica al procedimiento de digestión con colagenasa en dos etapas descrito en Li, A. P. et al. (1992) "Isolation And Culturing Of Hepatocytes From Human Liver", J. Tissue Cult. Meth. 14: 139-146.

Los hepatocitos se pueden cultivar en cualquier medio de cultivo de hepatocitos adecuado. A modo de ilustración y sin limitación se puede hacer mención de los siguientes medios de cultivo: medio esencial de Chee (Hamilton, G. A. et al. (2001) "Effects Of Medium Composition On The Morphology And Function Of Rat Hepatocytes Cultured As Spheroids And Monolayers", In Vitro Cell Dev Biol Anim. 37(10): 656-667; Zurlo, J. et al. (1996) "Characterization Of A Primary Hepatocyte Culture System For Toxicological Studies", In Vitro Cell Dev Biol Anim. 32(4): 211-220; Arterburn, L. M. et al. (1995) "A Morphological Study Of Differentiated Hepatocytes In Vitro", Hepatology 22(1): 175-187), medio de Eagle modificado (o Medio de Eagle modificado de Dulbecco) (Arikura, J. et al. (2002) "UW Solution: A Promising Tool For Cryopreservation Of Primarily Isolated Rat Hepatocytes", J Hepato-biliary Pancreat Surg. 9(6): 742-749; Washizu, J. et al. (2000) "Amino Acid Supplementation Improves Cell-Specific Functions Of The Rat Hepatocytes Exposed To Human Plasma", Tissue Eng. 6(5): 497-504; Iwata, H. et al. (1999) "In Vitro Evaluation Of The Metabolic Functions Of A Bioartificial Liver", ASAIO J. 45(4): 299-306; Stutenkemper, R. et al. (1992) "The Hepatocyte-Specific Phenotype Of Murine Liver Cells Correlates With High Expression Of Connexin32 And Connexin26 But Very Low Expression Of Connexin43", Exp Cell Res. 201(1): 43-54), medio de Leibowitz (Coundouris, J. A. et al. (1993) "Cryopreservation Of Human Adult Hepatocytes For Use In Drug Metabolism And Toxicity Studies", Xenobiotica 23(12):

1399-1409), Waymouth (Vind, C. et al. (1992) "Regulation By Growth Hormone And Glucocorticoids Of Testosterone Metabolism In Long-Term Cultures Of Hepatocytes From Male And Female Rats", Biochem Pharmacol. 44(8): 1523-1528; Nemoto, N. et al. (1991) "Proline Is Required For Transcriptional Control Of The Aromatic Hydrocarbon-Inducible P(1)450 Gene In C57BL/6 Mouse Monolayer-Cultured Hepatocytes", Jpn J Cancer Res. 82(8): 901-908; Dich, J. et al. (1988) "Long-Term Culture Of Hepatocytes: Effect Of Hormones On Enzyme Activities And Metabolic Capacity", Hepatology 8(1): 39-45; Goethals, F. et al. (1984) "Critical Biochemical Functions Of Isolated Hepatocytes As Sensitive Indicators Of Chemical Toxicity", Fundam Appl Toxicol. 4(3 Pt 1): 441-450), medio de Kreb (House, J. D. (2001) "Threonine¹ Metabolism In Isolated Rat Hepatocytes", Am J Physiol Endocrinol Metab. 281(6): E1300-1307; Irvine, F. et al. (1993) "Extracellular Calcium Modulates Insulin's Action On Enzymes Controlling Cyclic AMP Metabolism In Intact Hepatocytes", Biochem J. 293 (Pt1): 249-253; Marsh, D. C. et al. (1991) "Hypothermic Preservation Of Hepatocytes. III. Effects Of Resuspension Media On Viability After Up To 7 Days Of Storage", Hepatology 13(3): 500-508), etc.

En una variante preferida, los hepatocitos se criopreservan en un medio que contiene aproximadamente un 10 % de DMSO y aproximadamente un 90 % de suero fetal bobino (Loretz, L. J. et al. (1989) "Optimization Of Cryopreservation Procedures For Rat And Human Hepatocytes", Xenobiotica 19: 489-498; Ruegg, C. E. et al. (1997) "Cytochrome-P450 Induction And Conjugated Metabolism In Primary Human Hepatocytes After Cryopreservation", In Vitro Toxicol. 10: 217-222).

La viabilidad de los hepatocitos aislados se puede determinar usando cualquiera de una variedad de métodos. Preferiblemente, dicha viabilidad se determinará usando el método de exclusión de azul tripán (véase, por ejemplo, Berry, M. N. et al. (1992) "Techniques For Pharmacological And Toxicological Studies With Isolated Hepatocyte Suspensions", Life Sci. 51(1): 1-16). Por lo tanto, las frases "hepatocitos viables" o "porcentaje de viabilidad", como se usan en la presente invención, se refieren a la viabilidad de los hepatocitos evaluada usando el método de exclusión con azul tripán.

Criopreservación de los hepatocitos primarios aislados

Los hepatocitos se criopreservan preferentemente usando nitrógeno líquido y, más preferentemente, dentro de las 36 horas siguientes a su aislamiento. Las consideraciones para la criopreservación de hepatocitos humanos se analizan en Lloyd, T. D. R. et al. (2003) "Cryopreservation Of Hepatocytes: A Review Of Current Methods For Banking", Cell and Tissue Culture Banking 43-15. Los procedimientos adecuados para la criopreservación de hepatocitos también se pueden encontrar en los siguientes documentos: Adams, R. M. et al. (1995) "Efficient Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Human Hepatocytes With Recovery Of Viability, Differentiation, And Replicative Potential", Cell Transplant. 4(6): 579-586; Chesne, C. et al. (1993) "Viability And Function In Primary Culture Of Adult Hepatocytes From Various Animal Species And Human Beings After Cryopreservation", Hepatology 18(2): 406-414; Coundouris, J. A. et al. (1993) "Cryopreservation Of Human Adult Hepatocytes For Use In Drug Metabolism And Toxicity Studies", Xenobiotica 23(12): 1399-1409; Hewitt, N. J. et al. (2004) "Cryopreserved Rat, Dog, And Monkey Hepatocytes: Measurement Of Drug Metabolizing Enzymes In Suspensions And Cultures", Hum Exp Toxicol. 23(6): 307-316; Novicki, D. L. et al. (1982) "Cryopreservation Of Isolated Rat Hepatocytes", In Vitro. 18(4): 393-399; Shaddock, J. G. et al. (1993) "Cryopreservation And Long-Term Storage Of Primary Rat Hepatocytes: Effects On Substrate-Specific Cytochrome P450-Dependent Activities And Unscheduled DNA Synthesis", Cell Biol Toxicol. 9(4): 345-357; Zaleski, J. et al. (1993) "Preservation Of The Rate And Profile Of Xenobiotic Metabolism In Rat Hepatocytes Stored In Liquid Nitrogen", Biochem Pharmacol. 46(1): 111-116.

Preferiblemente, los hepatocitos aislados se suspenden en un medio crioprotector y las células suspendidas se dispensan en recipientes aptos para congelador. Un medio crioprotector comprende típicamente un medio de cultivo de hepatocitos que contiene al menos un crioprotector que minimiza los efectos nocivos de la criopreservación, tales como la formación de hielo intracelular durante la congelación. A modo de ilustración y sin limitación, se enumeran los siguientes crioprotectores comúnmente usados: dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol, aminoácidos, propanodiol y glicerol. Un crioprotector preferido de la presente invención es DMSO. Los crioprotectores adecuados y métodos para su uso en la criopreservación de hepatocitos se pueden encontrar, por ejemplo, en: Loretz, L. J. et al. (1989) "Optimization Of Cryopreservation Procedures For Rat and Human Hepatocytes", Xenobiotica 19(5): 489-498; Chesne, C. et al. (1993) "Viability And Function In Primary Culture Of Adult Hepatocytes From Various Animal Species And Human Beings After Cryopreservation", Hepatology 18(2): 406-414; Diener, B. et al. (1993) "A Method For Cryopreservation Of Liver Parenchymal Cells For Studies Of Xenobiotics", Cryobiology 30(2): 116-127; Lawrence, J. N. et al. (1991) "Development Of An Optimal Method For The Cryopreservation Of Hepatocytes And Their Subsequent Monolayer Culture", Toxicology In Vitro 5(1): 39-51; Houle, R. et al. (2003) "Retention Of Transporter Activities In Cryopreserved, Isolated Rat Hepatocytes", Drug Metab. Disposit. 31(4): 447-451; Silva, J. M. et al. (1999) "Induction Of Cytochrome-P450 In Cryopreserved Rat And Human Hepatocytes", Chem-Biol Interact. 121: 49-63.

Los hepatocitos aislados se suspenden preferentemente en un medio crioprotector como preparación para la congelación. Las células suspendidas se dispensan preferiblemente en recipientes resistentes al congelador a una densidad celular de aproximadamente 10^6 células/ml a aproximadamente 4×10^7 células/ml. Los volúmenes de congelación preferidos oscilan entre 0,1 y 10,0 ml. El volumen de congelación preferido es 1,0 ml.

A continuación, los hepatocitos dispensados se criopreservan preferiblemente usando un proceso de congelación de velocidad controlada, lo más preferiblemente a una velocidad de congelación de entre aproximadamente -1°C/min y aproximadamente -25°C/min hasta que se alcanza una temperatura final de aproximadamente -90°C. Durante la fase inicial del proceso de criopreservación, se puede emplear la siembra para inducir la cristalización controlada o la

5 formación de hielo en las suspensiones celulares que ya se han enfriado por debajo del punto de congelación del medio de cultivo. Dicha siembra sirve para minimizar el daño relacionado con la formación de hielo y, por lo tanto, puede ser beneficiosa para la viabilidad celular. Los métodos de siembra adecuados incluyen insertar una varilla de metal frío en los recipientes de congelación e introducir un chorro de nitrógeno líquido en los recipientes de congelación.

10 Una vez que se haya alcanzado la temperatura final deseada, las muestras de células congeladas se pueden transferir a congeladores de nitrógeno líquido para un almacenamiento prolongado. Las muestras congeladas se pueden almacenar en la fase líquida de nitrógeno líquido o en la fase gaseosa de nitrógeno líquido. Preferiblemente el almacenamiento se realiza en la fase gaseosa de nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se pueden almacenar de esta manera durante días, meses o años, teniendo el período de almacenamiento en la fase gaseosa de nitrógeno líquido poco efecto sobre la viabilidad y función posterior a la descongelación.

La descongelación de hepatocitos criopreservados

20 Las muestras congeladas se pueden descongelar para su posterior procesamiento eliminándolas de la presencia de nitrógeno líquido o vapor de nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se descongelan preferiblemente colocando inmediatamente las muestras en un baño de agua precalentado con una temperatura de entre aproximadamente 37°C y aproximadamente 42°C. Preferiblemente, las células se descongelan al menos hasta la etapa en la que se pueden desprender los trozos de hielo cuando se invierte el recipiente de la muestra. Luego, las células descongeladas se procesan preferiblemente rápidamente para eliminar las células del contacto con DMSO, por ejemplo mediante centrifugación en gradiente de Percoll (como se describe a continuación) o mediante lavados secuenciales.

25 En una variante preferida, las células se descongelan en el medio InVitroGRO CP Complete (In Vitro Technologies, Baltimore, MD; Roymans, D. et al. (2004) "Determination Of Cytochrome P450 1A2 And Cytochrome P4503a4 Induction In Cryopreserved Human Hepatocytes", Biochem Pharmacol. 67(3): 427-437). El medio se prepara descongelando el producto Torpedo Antibiotic Mix (In Vitro Technologies, Baltimore, MD) a 37°C en un baño de agua hasta que se descongela y luego se retira del baño de agua. Luego, se mezcla 1,0 ml del producto Torpedo Antibiotic Mix con 45 ml de medio InVitroGRO CP. Tras la adición del producto Torpedo Antibiotic Mix, la vida útil del medio completo es de 7 días. Cuando se descongela un solo vial, el medio InVitroGRO CP se precalienta a aproximadamente 37°C. Se añaden 5 ml de medio InVitroGRO CP calentado a un tubo cónico estéril de 50 ml. El vial de hepatocitos congelados se retira con cuidado del congelador. Si el vial se almacenó en la fase líquida, se retira la tapa con cuidado, se decanta el nitrógeno líquido presente en el vial y se vuelve a cerrar la tapa antes de colocar el vial en el baño de agua. Luego se prefiere sumergir inmediatamente el vial en un baño de agua a 37°C y agitar el vial suavemente hasta que el hielo se derrita por completo, pero no más tiempo del necesario para descongelar completamente el vial. Puede resultar útil quitar las etiquetas del vial para que sea más fácil ver el contenido del vial. Luego, el contenido descongelado se vacía en el medio InVitroGRO CP precalentado. Luego se añade 1,0 ml de medio InVitroGRO CP precalentado a cada vial para volver a suspender las células restantes. Luego se decanta o se pipetea el contenido del vial en la suspensión de hepatocitos. Los hepatocitos se vuelven a suspender preferiblemente invirtiendo suavemente el recipiente receptor (por ejemplo, vial, tubo de ensayo, etc.) varias veces (por ejemplo, tres).

30 35 40 45 Cuando se descongelan varios viales, se prefiere descongelar simultáneamente todos los viales en el baño de agua. Como antes, el medio (preferiblemente, medio InVitroGRO CP) se debe calentar a 37°C. Es conveniente asegurarse de que haya suficiente medio para permitir el uso de 5 ml de medio InVitroGRO CP precalentado por cada vial de hepatocitos criopreservados. Una vez descongelados los viales, se deben quitar rápidamente las tapas y verter su contenido en un tubo o vaso de precipitados estéril que contenga al menos 5 ml de medio InVitroGRO CP precalentado por vial descongelado. Por ejemplo, se emplean preferiblemente 25 ml de medio para 5 viales en un recipiente que puede contener un volumen de 50 ml.

45 Si se desea, se pueden determinar el recuento celular total y el número de células viables usando el método de exclusión de azul tripán. Las células se pueden diluir hasta $0,70 \times 10^6$ células viables/ml con medio InVitroGRO CP.

50 La reformulación de hepatocitos descongelados para permitir criopreservación y descongelación posteriores

55 Un aspecto se refiere a la capacidad de reformular las células descongeladas de modo que se puedan volver a congelar y descongelar en una o más ocasiones posteriores. Estas preparaciones de hepatocitos multicriopreservados tienen múltiples usos. Se pueden usar en hígados bioartificiales, trasplantes de células hepáticas, dispositivos de asistencia hepática, trasplantes de hepatocitos y aplicaciones *in vitro*. En particular, las preparaciones de hepatocitos multicriopreservados se pueden usar en estudios de metabolismo de fármacos *in vitro* (por ejemplo, para identificar hepatocitos con características únicas (por ejemplo, polimorfismos metabólicos, polimorfismos genéticos, etc.), en estudios sobre el destino metabólico del xenobiótico y en estudios sobre el efecto del xenobiótico en la alteración del perfil de las enzimas metabolizadoras de fármacos de los hepatocitos, en estudios de inhibición para determinar la Cl_{50} de xenobióticos sobre las enzimas y funciones hepáticas (por ejemplo, metabolismo del colesterol), en estudios

de inducción genética con xenobióticos, en estudios de inducción de proteínas con xenobióticos, en la evaluación de la toxicidad de xenobióticos en hepatocitos, en estudios de transporte con xenobióticos (por ejemplo, estudios sobre sistemas de transporte de la glicoproteína-P, transportadores de iones orgánicos, transportadores de cationes orgánicos, etc.), en estudios de aclaramiento metabólico de xenobióticos y en ensayos de eficacia (por ejemplo, procesamiento de lipoproteínas, gluconeogénesis, secreción de proteínas, etc.). También se pueden usar preparaciones de hepatocitos multicriopreservados para estudiar o propagar los virus de la hepatitis y otros virus y agentes infecciosos. Las células recuperadas se pueden reformular para su uso en estudios de ADN, ARNm o proteómicos o en estudios de polimorfismos metabólicos. Las preparaciones de hepatocitos multicriopreservados también se pueden usar en estudios de aclaramiento metabólico y en ensayos de eficacia (por ejemplo, procesamiento de lipoproteínas, gluconeogénesis, secreción de proteínas, etc.). Las células se pueden reformular para su uso en biorreactores de siembra para incubaciones a gran escala o como modelos para la regulación genética mediante micro-ARN, o para su uso en sistemas combinados con otros tipos de células (por ejemplo, células no parenquimatosas del hígado o células de otras fuentes, por ejemplo, células Caco-2).

Dicha reformulación puede comprender separar células viables y no viables antes de una recongelación posterior.

Para ello se usa preferentemente la centrifugación en gradiente de densidad. Por ejemplo, se puede emplear un procedimiento de centrifugación en gradiente de Percoll al 30 % (Madan, A. et al. (1999) "Effect Of Cryopreservation On Cytochrome P-450 Enzyme Induction In Cultured Rat Hepatocytes", DrugMetab. Dispos. 27(3): 327-335; Sun, E. L. et al. (1990) "Cryopreservation Of Cynomologus Monkey (*Macaca Fascicularis*) Hepatocytes For Subsequent Culture And Protein Synthesis Studies", In vitro Cell Development and Biology 25: 147-150; Lawrence, J. N. et al. (1991) "Development Of An Optimal Method For The Cryopreservation Of Hepatocytes And Their Subsequent Monolayer Culture", Toxicology In Vitro 5(1): 39-51; Dou, M. et al. (1992) "Thawed Human Hepatocytes In Primary Culture", Cryobiology 29(4): 454-69; Utessch, D. et al. (1992) "Characterization Of Cryopreserved Rat Liver Parenchymal Cells By Metabolism Of Diagnostic Substrates And Activities Of Related Enzymes", Biochemical Pharmacology 44: 309-315. Por ejemplo, las células descongeladas se pueden volver a suspender en un tampón de separación isotónico de Percoll al 30 % precalentado (aproximadamente 37°C) y luego centrifugar a 100 x g a temperatura ambiente durante veinte minutos para sedimentar las células viables. El sobrenadante se descarta y las células se vuelven a suspender directamente en un medio para una etapa de criopreservación posterior o para un procesamiento posterior antes de la criopreservación.

Las preparaciones criopreservadas que resultan de la congelación de una preparación previamente congelada-descongelada tendrán preferiblemente una viabilidad celular posterior a la descongelación superior al 70 %. Estas altas viabilidades permiten que la presente invención logre la congelación y descongelación repetidas de hepatocitos sin pérdidas inaceptables de células o la necesidad de fuentes de muestras cada vez mayores.

Preparaciones de hepatocitos combinados

La capacidad de la presente invención para permitir la congelación y descongelación repetidas de hepatocitos facilita adicionalmente la producción de preparaciones de hepatocitos combinados, especialmente preparaciones de hepatocitos humanos combinados. Como se analizó anteriormente, las muestras de hígado individuales producen hepatocitos con diferentes capacidades metabólicas. Para facilitar el uso reproducible o el estudio de los hepatocitos, es deseable minimizar las diferencias de los hepatocitos atribuibles a dicha variación de la muestra combinando hepatocitos de diferentes fuentes para obtener una preparación de hepatocitos compuesta o "promedio". Por lo tanto, tales preparaciones de hepatocitos compuestos se pueden formular para proporcionar una preparación con las actividades metabólicas de una muestra de hepatocitos "promedio" o una preparación cuyas funciones enzimáticas de los hepatocitos se aproximan a las funciones enzimáticas de hepatocitos de los hepatocitos recién aislados. Dichas actividades metabólicas pueden incluir, por ejemplo, algunas o todas de las siguientes actividades enzimáticas: cumarina 7-hidroxilasa (COUM), dextrometorfano O-desmetilasa (DEX), 7-etoxicumara O-Desetilasa (ECOD), actividades responsables del metabolismo de fase II de la 7-hidroxicumarina (7-HCG), actividades responsables del metabolismo de fase II de la 7-hidroxicumarina (7-HCS), mfenitoína 4-hidroxilasa (MEPH), testosterona 6(β)-hidroxilasa (TEST), tolbutamida 4-hidroxilasa (TOLB), fenacetina O-desetilasa (PHEN) o clorzoxazona 6-hidroxilasa (CZX). Los sustratos, métodos de medición y unidades de ensayo para los ensayos de dichas actividades metabólicas se proporcionan en la Tabla I.

Tabla I
Actividades metabólicas de los hepatocitos

Abreviatura	Sustrato/Ensayo	Método de Medición	Unidades
7-HCG	Glucurónido de 7-hidroxicumarina	Metabolismo de fase II de la 7-hidroxicumarina.	Pmol/min/10 ⁶ células
7-HCS	Sulfato de 7-hidroxicumarina	Metabolismo de fase II de la 7-hidroxicumarina.	Pmol/min/10 ⁶ células

NAT1	Ácido p-aminobenzoico	N-acetilación del ácido p-aminobenzoico	nmol/mg/min
NAT2	Sulfametasina	N-acetilación de la sulfametazina	nmol/mg/min
VBTY	Viabilidad	Exclusión de Azul Tripán™	porcentaje
AP	Fosfatasa alcalina	Kit de Sigma	unidades/mg de proteína
GGT	Gamma-glutamil transpeptidasa	Tinción con GGT	positivo
UGT1	7-hidroxicumarina	Metabolismo de fase II de la 7-hidroxicumarina.	169 pmol/mg/min
P450	Contenido de citocromo P450	Espectro de diferencia de monóxido de carbono	No determinado para criohepatocitos nmol/mg de proteína
CZX	Clorzoxazona	6-hidroxilación de la clorzoxazona	31,1 pmol/mg/min*
COUM	Cumarina	7-hidroxilación de la cumarina	50,0 pmol/mg/min*
DEX	Dextrometorfano	O-desmetilación del dextrometorfano	21,4 pmol/mg/min*
MEPH	Mefenitoína	4-hidroxilación de la mefenitoína	24,1 pmol/mg/min*
PHEN	Fenacetina	O-desetilación de la fenacetina	28,9 pmol/mg/min*
TEST	Testosterona	6(β)-hidroxilación de la testosterona	96,8 pmol/mg/min*
TOLB	Tolbutamida	4-hidroxilación de la tolbutamida	30,6 pmol/mg/min*
PROT	Contenido de proteínas	Kit de proteínas de Pierce	No determinado para criohepatocitos mg/ml
ECOD	Etoxicumarina	O-desetilación de la 7- etoxicumarina	37,3 pmol/mg/min*

Por ejemplo, las preparaciones preferidas de hepatocitos combinados producirán valores de ensayo dentro de los intervalos identificados en la Tabla II. Alternativamente, las muestras de hepatocitos usadas para formar la preparación combinada se pueden seleccionar para maximizar, minimizar o enfatizar ciertas funciones de los hepatocitos sobre otras funciones para producir una preparación combinada que exhiba un perfil deseado por el usuario de función(es) celular(es) hepática(s).

Las preparaciones de hepatocitos combinados comprenden hepatocitos obtenidos de la misma fuente en diferentes momentos, o de dos o más fuentes diferentes. Preferiblemente, las preparaciones de hepatocitos combinados resultarán de la combinación de hepatocitos obtenidos de tres, cuatro, cinco, seis o más fuentes diferentes.

10 Lo más preferiblemente, las preparaciones de hepatocitos combinados comprenderán al menos una población de hepatocitos que se criopreservaron antes de la combinación. Por ejemplo, una preparación de hepatocitos combinados puede comprender una o más muestras de hepatocitos que se criopreservaron antes de combinarlas con una o más muestras de hepatocitos recién aisladas. Alternativamente, una preparación de hepatocitos combinados puede comprender sólo muestras de hepatocitos que fueron previamente criopreservadas. La Tabla II proporciona el intervalo normal (es decir, el intervalo entre el mínimo y el máximo del ensayo para cada ensayo). Los valores de la Tabla II son datos derivados de los últimos lotes 150+ de hepatocitos humanos criopreservados

Tabla II	
Ensayos de hepatocitos	
Ensayo	Intervalo normal (pmol/min/10 ⁶ células)
7-hidroxilación de la cumarina	1 a 154
O-desmetilación del dextrometorfano	0,5 a 96
O-desetilación de la 7-eticumaria	1 a 154
Metabolismo de fase I de la 7-hidroxicumaria.	2 a 545
Metabolismo de fase II de la 7-hidroxicumaria.	0 a 110
4-hidroxilación de la mefenitoína	0,2 a 442
6(beta)-hidroxilación de la testosterona	2 a 675
4-hidroxilación de la tolbutamida	1,8 a 82
O-desetilación de la fenacetina	1 a 125
6-hidroxilación de la clorzoxazona	2 a 215

En ciertas variantes, las preparaciones de hepatocitos tendrán valores de ensayo en los intervalos indicados anteriormente para al menos tres, y preferiblemente para al menos cuatro, aún más preferiblemente para al menos seis, y lo más preferiblemente para al menos ocho de los siguientes ensayos: el ensayo de COUM; el ensayo de DEX; el ensayo de ECOD; el ensayo de 7-HCG; el ensayo de 7-HCS; el ensayo de MEPH; el ensayo de TEST; el ensayo de TOLB; el ensayo de PHEN; el ensayo de CZX.

Si se desea, los hepatocitos criopreservados se pueden cultivar en placas de cultivo de tejidos revestidos con colágeno, o placas de cultivo de tejidos revestidos con otras proteínas de la matriz extracelular que incluyen, entre otras, laminina, fibronectina, entactina, poli-L-lisina, gelatina o cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, esto se logra diluyendo un volumen apropiado (por ejemplo, de 0,2 ml a 2,5 ml) de células diluidas (por ejemplo, células con una concentración de aproximadamente $0,7 \times 10^6$ células/ml) en las placas. Para el cultivo en placas de microtitulación de 96 pocillos, es deseable diluir aún más la suspensión celular hasta una concentración de $0,35 \times 10^6$ células/ml con el medio InvitroGRO CP y añadir 100 μ l de la suspensión celular a cada pocillo. Se prefiere distribuir uniformemente las células en los pocillos. Esto se puede lograr agitando suavemente las placas de un lado a otro y de lado a lado; el uso de un movimiento circular hará que las células se acumulen de manera desigual en el centro de los pocillos. Los hepatocitos humanos manipulados de esta manera se adherirán a las placas en 2 a 4 horas; sin embargo, si se desea una manipulación mínima, se puede dejar que las células se adhieran durante la noche.

Habiendo descrito ahora en general la invención, la misma se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración.

Ejemplo 1

Recongelación de preparaciones de hepatocitos descongelados

Los hepatocitos criopreservados se descongelen y se vuelven a congelar como se indica a continuación.

Materiales: Jeringa de 30 cc, dos acopladores, Percoll en una bolsa de 1 litro, medio InvitroGro CP-2 en una bolsa de 2 litros, vaso de precipitados esterilizado en autoclave de 1-2 litros, calentador, baño de agua y gradilla para tubos de centrífuga.

Procedimiento:

1) Ajustar un calentador de baño de agua recirculante a 37-42°C.

2) Añadir aproximadamente 200-400 ml del medio InvitroGro CP-2 a un vaso de precipitados de 1-2 litros. Equistar la cabina de seguridad biológica con una pipeta manual o un robot de manipulación de líquidos.

- 3) Retirar aproximadamente 50 viales criogénicos del receptor Dewar y colocarlos rápidamente en 2 gradillas para tubos de ensayo. Cuando sea posible, separar los viales.
- 4) Sumergir las suspensiones de células sólidas en un baño de agua calentado hasta que los trozos de hielo se puedan desprender al invertir el vial.
- 5) 5) Verter la suspensión celular de cada vial en el vaso de precipitados. Añadir 1 ml del medio InvitroGro CP-2 desde el vaso de precipitados pequeño a cada vial para enjuagar y verter el contenido en el vaso de precipitados. Transferir la suspensión de células descongeladas a una bolsa estéril de 1 litro.
- 6) Unir a la bolsa, el medio InvitroGro CP-2 en una bolsa de 2 litros y el Percoll en bolsas al 30 % en el procesador celular COBE automatizado y procesar según las prácticas estándar.
- 10 7) Realizar un recuento celular.
- 8) Criopreservar la suspensión celular.

Para la centrifugación en gradiente de densidad de Percoll se emplea Percoll/RediGrad™ (Amersham Biosciences). El producto Percoll está compuesto de sílice coloidal revestida con polivinilpirrolidona (PVP). La formulación RediGrad™ también está compuesta de sílice coloidal pero está revestida covalentemente con silano. Se cree que estos revestimientos hacen que el material no sea tóxico y sea ideal para su uso con materiales biológicos (http://www.apczech.cz/pdf/DF_Redigrad.pdf; [http://www5.amershambio sciences.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=3139FC720067CA6CC1256F360008566F&file=71500870AB.pdf](http://www5.amershambio sciences.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=3139FC720067CA6CC1256F360008566F&file=71500870AB.pdf)). Ambas partículas tienen una densidad de 1,13 g/ml. La centrifugación de las muestras en presencia de Percoll/RediGrad da como resultado la formación espontánea de un gradiente de densidad debido a la heterogeneidad de los tamaños de partículas en el medio.

25 El conjunto Percoll/RediGrad se usan mejor en disoluciones salinas equilibradas, tal como una disolución salina fisiológica (NaCl 0,15 M), aunque se puede emplear sacarosa 0,25 M. La adición de 9 partes (v/v) de Percoll/RediGrad a 1 parte (v/v) de NaCl 1,5 M, o de medio de cultivo celular concentrado 10 x, o de sacarosa 2,5 M dará como resultado una disolución ajustada a aproximadamente 340 mOs/kg H₂O. Se pueden producir disoluciones de diferente presión osmótica ajustando los volúmenes relativos de Percoll/RediGrad y de la disolución de sal o sacarosa. (Vicente, R. et al. (1984) "Adjustment Of The Osmolality Percoll For The Isopycnic Separation of Cells and Cell Organelles", Anal Biochem. 141(2): 322-328). El ajuste final a la osmolalidad requerida se puede realizar mediante la adición de sales o agua destilada. También se pueden usar satisfactoriamente concentraciones distintas de 10 x de disolución salina fisiológica.

30 30) El conjunto Percoll/RediGrad formará gradientes autogenerados mediante centrifugación en cabezales de rotor de ángulo fijo después de 15 minutos. Los hepatocitos se pueden separar mediante centrifugación a 50-100 g_{av} en cabezales de rotor de ángulo fijo o de cubeta oscilante después de 10 a 30 minutos.

Ejemplo 2

Variación de las muestras de hepatocitos primarios

35 35) Para ilustrar la variación entre muestras de diferentes fuentes de hepatocitos individuales (no combinados), se aislan hepatocitos de 82 donantes diferentes y se analizan la viabilidad celular y la función enzimática. Se evalúan las siguientes actividades metabólicas: COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, 7-HCS, MEPH, TEST, TOLB, PHEN y CZX. En la Tabla III se muestran los resultados.

Tabla III.												
Variación de muestras de hepatocitos												
Nº Lote	Sexo	V %	COUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
067	M	62 %	67	1	70	231	24	2	44	35	27	24
086	F	74 %	51	23	10	50	9	1	38	13	BQL	18
089	F	77 %	25	21	8	23	6	1	11	13	BQL	29
090	F	74 %	30	25	7	13	BQL	2	19	15	BQL	16
091	F	73 %	13	29	66	44	10	12	252	36	27	36
094	F	67 %	41	12	37	24	4	21	126	40	19	87
099	F	86 %	21	15	7	4	BQL	1	60	10	BQL	22

ES 2 965 619 T3

104	M	81 %	63	21	44	247	25	2	58	37	8	20
105	M	67 %	59	15	24	38	14	1	29	27	12	27
110	F	77 %	45	24	35	23	4	6	206	11	54	36
111	F	71 %	4	10	9	2	3	3	147	2	19	19
114	F	75 %	39	23	21	10	5	5	59	TBD	3	45
122	M	79 %	26	30	29	80	5	1	42	23	4	25
129	F	90 %	4	24	27	67	18	1	16	33	10	51
ACU	F	81 %	53	8	25	74	18	8	80	16	4	23
AIT	F	83 %	45	29	13	118	14	BQL	82	15	11	7
OK	M	73 %	60	21	58	283	64	5	86	30	24	21
ATR	M	73 %	7	11	1	39	11	BQL	11	8	3	4
FAV	M	70 %	59	13	50	210	29	BQL	54	37	11	24
BTP	M	88 %	66	29	36	214	25	3	50	45	11	12
CCA	M	86 %	47	26	17	105	27	21	32	57	38	36
CEK.	F	80 %	55	2	39	141	5	16	302	41	7	16
CHD	F	77 %	30	14	53	471	42	4	28	23	13	26
CPN	M	81 %	28	6	40	100	13	2	168	14	37	21
ECM	M	85 %	8	11	10	55	18	6	81	18	21	9
ALE	M	69 %	9	9	35	47	5	18	66	12	47	67
BHI	F	90 %	88	3	56	291	45	1	248	21	45	43
EJR	F	75 %	89	14	32	288	43	8	62	41	1	41
ENR	M	73 %	69	28	27	124	31	107	77	36	38	32
EOB	M	88 %	14	11	18	65	9	31	49	14	21	35
ETR	F	88 %	30	1	34	13	13	7	13	13	37	69
EVY	M	80 %	2	20	23	218	77	33	24	25	17	38
FNL	M	85 %	17	27	62	282	32	6	6	50	14	24
FRW	M	75 %	46	22	16	106	17	48	25	54	44	8
GBE	F	77 %	5	49	31	165	20	2	16	19	5	54
GNV	F	74 %	57	17	33	54	a	5	95	22	16	22
GTV	F	71 %	32	6	8	47	7	BQL	40	28	16	11
GUY	M	92 %	65	12	11	73	12	20	90	13	5	8
HHG	M	83 %	2	8	14	251	29	BQL	28	12	4	40
HRU	M	90 %	43	28	39	175	15	4	69	40	57	44
ICJ	M	74 %	134	20	60	287	17	BQL	129	82	28	7
IBM	M	88 %	34	17	23	129	34	72	48	23	19	34

ES 2 965 619 T3

IHR	F	76 %	17	43	8	84	9	9	95	46	41	7
LID	M	86 %	36	31	50	307	54	1	142	49	21	51
IRX	F	73 %	57	5	40	172	24	12	113	43	6	18
JUL	M	82 %	7	11	3	41	9	7	23	12	2	3
KK5	M	83 %	1	8	27	319	38	BQL	61	17	17	42
KPT	F	83 %	9	12	32	248	30	55	65	26	56	32
KRJ	F	76 %	6	40	76	359	37	1	11	61	23	20
KRM	F	78 %	126	36	55	83	17	103	98	46	74	44
K5E	M	73 %	65	27	52	206	74	21	123	42	93	16
KZO	F	82 %	38	16	38	262	8	6	75	32	30	20
LAE	M	76 %	58	15	50	294	22	14	67	63	125	21
MOF	F	91 %	79	17	29	10	12	2	85	5	7	46
MRS	M	72 %	119	21	110	450	50	2	675	54	68	28
MTR	F	69 %	2	33	23	218	3	5	38	67	39	8
MYO	F	94 %	40	24	9	24	BQL	BQL	12	7	BQL	11
NPX	F	79 %	36	32	13	130	6	15	76	25	20	10
NQT	M	85 %	76	12	39	80	23	2	151	14	20	34
OUA	F	81 %	47	26	24	86	8	6	85	46	53	13
OZL	M	76 %	16	15	61	300	109	3	165	29	17	43
PFM	F	87 %	21	1	11	67	10	3	116	8	es	33
PXK	M	80 %	86	35	63	433	78	2	109	62	32	60
QWG	F	77 %	16	32	29	300	21	9	50	10	BQL	15
REL	F	77 %	40	20	15	109	9	65	100	33	75	10
RFA	F	78 %	130	42	49	444	52	6	195	30	28	17
RKB	F	95 %	42	16	16	100	8	3	36	17	20	19
RML	F	76 %	BQL	6	45	129	31	14	152	24	42	29
RNG	F	91 %	119	14	97	298	27	177	207	34	71	41
ROE	F	82 %	73	24	36	302	37	2	55	17	2	51
SEO	F	72 %	36	25	18	106	9	66	102	50	81	11
SQJ	F	74 %	115	12	100	285	19	175	210	30	81	42
SRA	M	79 %	50	6	71	409	84	10	23	28	18	44
TPZ	F	83 %	120	13	101	301	26	171	204	31	82	41
TSR	F	62 %	47	66	58	175	20	BQL	6	77	16	34
VCM	M	82 %	42	28	79	415	110	0.2	94	16	4	215
VEN	F	70 %	79	69	89	328	53	2	32	58	48	81

VTA	M	78 %	32	1	25	84	12	5	120	21	40	15
WWW	M	84 %	42	1	27	127	12	6	58	21	16	37
ZAG	M	85 %	35	28	39	96	73	1	11	42	17	18
ZCR	M	80 %	84	11	39	160	22	38	14	57	20	18
ZIJ	M	72 %	6	33	31	320	29	13	25	34	3	13
BQL (por debajo del límite de cuantificación) TBD (por determinar)												

Ejemplo 3

Caracterización de hepatocitos combinados

5 Se preparan lotes de hepatocitos combinados criopreservados y se analizan para determinar la viabilidad y la función enzimática posterior a la descongelación. Se evalúan las siguientes actividades metabólicas: COUM, DEX, ECOD, 7-HCG, 7-HCS, MEPH, TEST, TOLB, PHEN y CZX.

10 Se preparan seis lotes de hepatocitos combinados, que comprenden grupos de cinco donantes o grupos de diez donantes, como se describe anteriormente. Los hepatocitos se recolectan de donantes individuales y luego se criopreservan en lotes individuales usando nitrógeno líquido como agente de congelación. La criopreservación se logra suspendiendo los hepatocitos en viales aptos para congelador que contienen un medio con aproximadamente un 10 % de DMSO y aproximadamente un 90 % de medio de criopreservación. Luego, los hepatocitos dispensados se congelan en un congelador de velocidad controlada hasta que se alcanza una temperatura final de aproximadamente -80°C.

15 Para formar las preparaciones de hepatocitos combinados, se descongelan lotes individuales y las células viables se aíslan mediante centrifugación en gradiente de Percoll. Los viales de hepatocitos criopreservados de donantes individuales se descongelaron en un baño de agua a 37°C (¿Tal vez sería mejor dar un intervalo como un baño de agua de 30-40°C?) durante 60-90 segundos. Las células descongeladas se decantan en un medio a 37°C que contiene un 30 % de Percoll isotónico y un 70 % de medio CP-2. La suspensión celular se centrifuga a 100 g durante 20 minutos.

20 Las células viables se recuperan en el medio de criopreservación y se cuentan. Las células viables se diluyen a 20 millones de células por ml. Se prepara una segunda disolución que contiene un 20 % de DMSO y un 80 % de medio de criopreservación (volumen igual a la suspensión celular mencionada anteriormente). Se añaden lentamente un 20 % de DMSO y un 80 % de medio de criopreservación a la mezcla de suspensión de celular. La adición tarda entre 5 y 10 minutos. La mezcla resultante es un 10 % de DMSO, un 90 % de medio de criopreservación con células a razón de 10 millones de células por ml. Esta disolución se distribuye en alícuotas en viales criogénicos a razón de 1,0 ml por vial. Luego, se criopreservan las células. Luego se combinan las células viables procedentes de lotes individuales para formar preparaciones de hepatocitos combinados cuyas células tienen valores de ensayo funcionales dentro de los intervalos deseados.

25 30 Luego, se criopreservan los lotes combinados. La Tabla IV dada a continuación muestra los resultados de la viabilidad ("V %") y el análisis de la función enzimática de los lotes combinados posterior a la descongelación. Como se indica en la Tabla III, los lotes combinados tuvieron una viabilidad promedio del 79 % (D.E. $\pm 6\%$).

Tabla IV
Resumen de datos combinados de lotes de hepatocitos

Combinado	V %	COUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
MJI ^a	89	63	28	66	301	44	12	70	61	50	62
YDJ ^a	72	66	30	80	470	41	1	165	31	27	71
APO ^b	79	79	21	55	276	43	2	112	22	26	30
HMB ^b	76	61	18	70	231	46	3	151	23	20	83
JUI ^b	75	32	19	35	232	44	2	124	32	11	42
RKS ^b	81	84	20	73	336	53	2	131	28	23	55

^a lotes de 5 donantes ^b lotes de 10 donantes

- Para comparación, la Tabla V dada a continuación muestra los datos resumidos para un análisis de viabilidad y función enzimática posterior a la descongelación de ochenta y un lotes individuales que están criopreservados (es decir, sujetos a un ciclo de criopreservación). Estos datos confirman que la variabilidad entre lotes de la función enzimática encontrada en fuentes de hepatocitos individuales es muy alta. Los datos confirman la conveniencia de emplear preparaciones de hepatocitos combinados para proporcionar células criopreservadas que se aproximen a la función enzimática de los hepatocitos "promedio" para una amplia variedad de enzimas.
- 5

Tabla V											
Resumen de los datos de lotes de hepatocitos combinados											
	V %	COUM	DEX	ECOD	7-HCG	7-HCS	MEPH	TEST	TOLB	PHEN	CZX
Promedio	79	37	17	51	276	27	8	35	35	15	19
Alto	95	134	69	110	471	110	177	675	82	125	215
Bajo	62	6	1	31	231	24	2	25	34	3	13

Ejemplo 3

- 10 Caracterización de la viabilidad de hepatocitos combinados después de la descongelación

Un uso común de los hepatocitos criopreservados es descongelarlos y luego incubarlos con varios xenobióticos. Para ello se prefiere que los hepatocitos mantengan su viabilidad durante al menos varias horas. Para examinar la viabilidad posterior a la descongelación a lo largo del tiempo de un lote de hepatocitos criopreservados combinados, las células se descongelaron, se dividieron en alícuotas en los pocillos de una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂. A continuación se mide la viabilidad de los hepatocitos en puntos temporales de hasta seis horas. La Tabla VI muestra los resultados de este análisis, en donde, a las seis horas, el 39 % de los hepatocitos permanecían viables

15

Tabla VI	
Análisis de viabilidad posterior a la descongelación de un lote de hepatocitos combinados	
Punto de tiempo	% Viabilidad ^a
T=0	88 %
0,5 horas	79 %
1,0 horas	84 %
2,0 horas	79 %
3,0 horas	73 %
4,0 horas	67 %
6,0 horas	69 %

^a Viabilidad determinada por Azul Tripán

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una preparación deseada de hepatocitos multicriopreservados, siendo dichos hepatocitos capaces de congelarse y descongelarse al menos dos veces, y en el que son viables más del 70% de los hepatocitos de dicha preparación, comprendiendo dicho método:
 - 5 (A) someter los hepatocitos que han sido congelados y descongelados a separación por gradiente de densidad para separar hepatocitos viables de hepatocitos no viables,
 - (B) recuperar los hepatocitos viables separados, y
 - (C) criopreservar los hepatocitos viables recuperados para formar de este modo dicha preparación deseada de hepatocitos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha separación por gradiente de densidad comprende una centrifugación en gradiente de densidad de Percoll.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dichos hepatocitos se seleccionan del grupo que consiste en: hepatocitos humanos, hepatocitos porcinos, hepatocitos de simio, hepatocitos caninos, hepatocitos felinos, hepatocitos bovinos, hepatocitos equinos, hepatocitos ovinos y hepatocitos de roedores.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha preparación comprende una preparación combinada de hepatocitos de múltiples fuentes.
 5. El método de la reivindicación 4, en donde dichas múltiples fuentes son del mismo género, raza o estado de salud.
 6. El método de la reivindicación 4, en donde los hepatocitos de dicha preparación combinada de hepatocitos proporcionan a dicha preparación combinada un nivel deseado de actividad metabólica.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha actividad metabólica se selecciona del grupo que consiste en cumarina 7-hidroxilasa (COUM), dextrometorfano O-desmetilasa (DEX), 7-eticumarina O-desetilasa (ECOD), 7-hidroxicumarina (7-HCG), 7-hidroxicumarina (7-HCS), mefenitoína 4-hidroxilasa (MEPH), testosterona 6(β)-hidroxilasa (TEST), tolbutamida 4-hidroxilasa (TOLB), fenacetina O-desetilasa (PHEN) y clorzoxazona 6- hidroxilasa (CZX).
8. El método de la reivindicación 1, en donde son viables más del 80 % de los hepatocitos de dicha preparación.